

Project 417.0000

Ontwikkeling van snelle microscopische screeningsmethoden voor de bepaling van de identiteit, zuiverheid, samenstelling van agrarische produkten en/of aanwezigheid van schadelijke bestanddelen hierin

Projectleider: W.J.H.J. de Jong

Rapport 95.41

december 1995

MICROSCOPISCHE IDENTIFICATIE VAN ONGEWENSTE PRODUCTEN IN DIERVOEDERS

W.J.H.J. de Jong

afdeling: Microbiologie & Biotechniek

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 0317-475400

Telefax 0317-417717

Copyright 1995, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (2x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

leesplank (2x)

dr. J.P. Hoogland

dr. J. de Jong

drs. W.J.H.J. de Jong

V.G.Z. Pinckaers

L.G.T.M. Pricken

J.J.M. Vliege

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Ministerie LNV, Directie Wetenschap en Kennisoverdracht

Ministerie LNV, Directie Landbouw (ir. G. de Peuter)

Ministerie WVS, Veterinaire hoofdinspectie (Dr. W. Edel)

Produktschap voor Veevoeder (ing. J. den Hartog)

Algemene Inspectie Dienst (Dhr. J.H. Netjes)

Belastingdienst, Laboratorium (Drs. G.J. Sluis, Drs. T. Knol)

ABSTRACT

Microscopische identificatie van ongewenste producten in diervoeders

Microscopical identification of undesirable products in animal feeds (in Dutch)

Report 95.41

December 1995

W.J.H.J. de Jong

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

1 table, 1 annex, 16 pages, 12 references

Microscopic examination is a useful technique for the identification of ingredients in animal feeds. Some plant constituents have been designated as 'undesirable products' in animal nutrition. The maximum permitted content of undesirable products has been fixed in Directive 74/63/EEC. In this report a survey is given of microscopical identification of undesirable products as mentioned in this EC-legislation. Relevant information is given of the origin, structure and characteristic features of these products.

Keywords: undesirable products, microscopical identification, animal feeds.

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 OVERZICHT ONGEWENSTE PRODUCTEN	8
2.1 Moederkoren (<i>Claviceps purpurea</i>)	8
2.2 Giftige onkruidzaden	8
2.2.1 <i>Lolium temulentum L.</i>	8
2.2.2 <i>Lolium remotum Schrank</i>	9
2.2.3 <i>Datura stramonium L.</i>	9
2.3 Ricinus - <i>Ricinus communis L.</i>	9
2.4 <i>Crotalaria spp.</i>	10
3 MATERIAAL EN METHODEN	10
3.1 Monstermateriaal	10
3.2 Methoden van onderzoek	10
3.2.1 Monstervoorbereiding	10
3.2.2 Microscopisch onderzoek	11
3.2.3 Opnametechniek	12
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	12
4.1 Moederkoren (<i>Claviceps purpurea</i>)	12
4.2 Giftige onkruidzaden	12
4.2.1 Dolik - <i>Lolium temulentum L.</i>	12
4.2.2 Vlasdolik - <i>Lolium remotum Schrank</i>	13
4.2.3 Doornappelzaad - <i>Datura stramonium L.</i>	13
4.3 Ricinuszaden - <i>Ricinus communis L.</i>	13
4.4 <i>Crotalaria</i> zaden - <i>Crotalaria spp.</i>	14
5 CONCLUSIES	14
LITERATUUR	15
BIJLAGE	

SAMENVATTING

Op grond van wettelijke regelingen (Richtlijn EG Nr. L 38/31 en Verordening Vvr.Ongewenste stoffen en produkten 1988) worden aan diervoeders bepaalde zuiverheidseisen gesteld ondermeer ten aanzien van de aanwezigheid van ongewenste stoffen en produkten. Het betreft ongewenste produkten zoals moederkoren, giftige onkruidzaden waaronder dolik en doornappelzaad en verder ricinuszaad en crotalariazaad.

De identificatie hiervan wordt zowel stereomicroscopisch (vergroting 8* tot 50*) als microscopisch (vergroting 100*, 160* en 400*) uitgevoerd. Bij het microscopisch onderzoek wordt gebruik gemaakt van verschillende insluitmiddelen en reagentia. Aan de hand van specifieke morfologische, anatomische en histologische kenmerken van karakteristieke bestanddelen vindt de identificatie plaats. In het rapport wordt een beschrijving van deze waarnemingen gecombineerd met botanische gegevens uit de literatuur per produkt weergegeven.

Van de belangrijkste c.q. meest karakteristieke kenmerken van deze ongewenste produkten zijn microscopische beelden opgenomen in het databankprogramma 'Treasury' en uitgeprint met een kleurenprinter (NEC Colormate PS/80, 300 dpi).

BIJLAGE

Afbeeldingen van de belangrijkste kenmerken op grond waarvan ongewenste produkten kunnen worden geïdentificeerd.

1 INLEIDING

Microscopisch onderzoek is een belangrijke techniek voor de kwaliteitscontrole van diervoeders. Dit onderzoek wordt ondermeer toegepast voor de controle van de identiteit en zuiverheid van diervoedergrondstoffen, de controle van de botanische samenstelling van mengvoeders en de opsporing van schadelijke bestanddelen en ongewenste producten in diervoeders.

In het kader van de EG-dievoederwetgeving is er een Richtlijn van kracht die handelt over de aanwezigheid van ongewenste stoffen en producten in de diervoeding (Richtlijn 74/63/EEG) [1]. Deze Richtlijn is opgenomen in de nationale wetgeving als Verordening Vvr. Ongewenste stoffen en producten 1988 [2]. In deze Verordening wordt in de Bijlage I, onder 2, een aantal plantaardige producten genoemd die door middel van microscopisch onderzoek kunnen worden geïdentificeerd en gekwantificeerd. (Zie TABEL I).

Ongewenste stoffen en producten	Diervoeders	Maximumgehalte in mg/kg (ppm) in het diervoeder herleid tot een vochtgehalte van 12%
2.7 Moederkoren (<i>Claviceps purpurea</i>)	Alle diervoeders die geen gemalen graan bevatten	1.000
2.8 Onkruidzaden en niet gemalen of verpulverde vruchten, die alkaloiden, glucosiden of andere giftige stoffen bevatten afzonderlijk of te zamen, waaronder	Alle diervoeders	3.000
a. <i>Lolium temulentum</i> L.		1.000
b. <i>Lolium remotum</i> Schrank		1.000
c. <i>Datura stramonium</i> L.		1.000
2.9 Ricinus - <i>Ricinus communis</i> L.	Alle diervoeders	10 (uitgedrukt in ricinusdoppen)
2.10 <i>Crotalaria</i> spp.	Alle diervoeders	100

TABEL I. Overzicht ongewenste botanische producten [1,2].

In dit rapport worden korte omschrijvingen gegeven ten aanzien van de herkomst en toxiciteit van de in de Verordening genoemde ongewenste plantaardige producten. Daarnaast worden de belangrijkste microscopische kenmerken beschreven op grond waarvan deze ongewenste producten kunnen worden geïdentificeerd.

2 OVERZICHT ONGEWENSTE PRODUCTEN

2.1 Moederkoren (*Claviceps purpurea*)

Onder moederkoren (*Secale cornutum*, *Fungus secalis*) verstaat men een ruststadium (sclerotium) van de schimmel *Claviceps purpurea* (fam. *Clavicipitaceae*, *Ascomycetae*). Deze schimmel komt vooral voor op rogge, veel minder op tarwe, gerst en ook op andere granen en grassen. In plaats van de roggekorrel ontwikkelt zich een 2 tot 5 cm lang en circa 0,5 cm breed sclerotium bestaande uit opeen gepakte schimmelhyphen [3]. De sclerotiën vallen op de grond (overwinteren) en "kiemen" in het voorjaar. Door de wind worden de sporen naar granen en grassen gebracht tijdens de bloei. Op de plant ontstaat na enige dagen zogenaamde honingdauw. De secundaire sporen hiervan worden door de regen of door insecten verder verspreid. De kiem van een geïnfecteerde bloem wordt gedood en vervangen door een harde paarszwarte structuur - een nieuw sclerotium. Deze valt weer op de grond of wordt met de zaden geogst. De toxiciteit van moederkorensclerotiën wordt toegeschreven aan een aantal stoffen waaronder lyserginezuuralkaloiden (ca. 0,05-0,2%), ergometrine en peptide-alkaloiden (ergotamine, ergosine, ergocristine, ergocryptine, ergocornine, ergomatrine e.a.) [4,5]. Moederkoren leidt bij alle diersoorten tot sterke vergiftigingsverschijnselen zoals kolieken, zware maag- en darmontstekingen, verlammingen, afsterven van extremiteiten, verwerpen en sterfte [5]. Moederkoren mag maximaal tot 0,1% in alle diervoeders voorkomen, die geen gemalen graan bevatten [1,2]. Doordat gemalen granen worden uitgezonderd en moederkoren daar mogelijk juist in voor kan komen, is het onwaarschijnlijk dat een diervoeder op grond van de aanwezigheid van moederkoren niet aan de gestelde eis voldoet.

2.2 Giftige onkruidzaden

Het betreft hier onkruidzaden en niet gemalen of verpulverde vruchten, die alkaloiden, glucosiden en andere giftige stoffen bevatten, afzonderlijk of te zamen, waaronder *Lolium temulentum* L., *Lolium remotum* Schrank en *Datura stramonium* L. [2].

2.2.1 *Lolium temulentum* L.

Dolikzaden (*Lolium temulentum* L., fam. *Gramineae*) bevinden zich vaak in granen speciaal in haver en rogge. In uitwendige vorm lijkt dolikzaad iets op haver en in het Duits wordt het ook wel 'Schwindelhafer' genoemd. Het zaad bevat het toxische alkaloid temuline (tot 0,06%). Temuline wordt gevormd door een endofytische schimmel *Endoconidium temulentum* waarvan de hyphen in het zaad van dolik tussen perispermium en aleuronlaag liggen. Deze schimmel komt bij 70 tot 96% van de dolikzaden voor. Temuline veroorzaakt duizeligheid, krampen en verlammingen [5].

Omdat dolik in ons land vrij zeldzaam is en er een grote hoeveelheid van nodig is om vergiftigingsverschijnselen te veroorzaken is het niet waarschijnlijk dat zich vaak problemen met dolikzaden zullen voordoen.

2.2.2 *Lolium remotum* Schrank.

Vlasdolikzaden (*Lolium remotum* Schrank, fam. Gramineae) hebben de zelfde toxische werking. Vlasdolik komt met name voor als onkruid tussen vlas (lijnzaad). Ook hier wordt in een deel van de zaden een schimmelmycelium gevonden [5]. De kans dat vlasdolik wordt aangetroffen in de diervoedergrondstoffen lijkt tegenwoordig niet bijzonder groot onder andere door het terugdringen van akkeronkruiden en de verbeterde reinigings- en behandelingsmethoden.

2.2.3 *Datura stramonium* L.

Doornappelzaad (*Datura stramonium* L., fam. Solanaceae) komt algemeen voor op bouwland en langs wegen. De gehele plant is zeer toxisch en bevat een drietal narcotisch werkende alkaloiden namelijk atropine, hyoscyamine en scopolamine. De zaden bevatten 0,2 tot 0,4% alkaloiden. Het ziektebeeld dat wordt veroorzaakt door het opnemen van de zaden komt overeen met dat van bilsenkruid. Door de alkaloiden worden de parasympatische zenuwen verlamd. Het vergiftigingsbeeld bestaat uit versnelde ademhaling en hartfrequentie, pupilverwijding, krampaanvallen en in een later stadium verlamming en de dood volgt door ademstilstand [5]. De gemalen zaden komen regelmatig voor in sojaschroot en andere schroten van oliehoudende zaden en granen uit de subtropen.

In de Bijlage bij de Verordening Vvr Ongewenste stoffen en produkten 1988 wordt een maximumgehalte aan doornappelzaad en wel *D. stramonium* toegestaan van maximaal 0,1%. Andere soorten doornappelzaad worden niet vermeld. Deze kunnen worden gerangschikt onder onkruidzaden, die alkaloiden bevatten waarvoor een maximumgehalte van 0,3% is toegestaan [2]. Sinds een aantal jaren worden hoge gehalten aan *D. ferox* vastgesteld in het bijzonder in Argentijnse en Braziliaanse sojaschroot. *D. ferox* is een wijdverbreid onkruid in Zuid Amerika. Het alkaloidgehalte van beide doornappelzaadsoorten is van gelijke orde. Op grond hiervan zou in de Verordening geen onderscheid tussen *D. stramonium* en *D. ferox* gemaakt moeten worden [6].

2.3 *Ricinus communis* L.

Ricinus (*Ricinus communis* L., fam. Euphorbiaceae) stamt mogelijk uit India of tropisch Noordoost Afrika. De plant wordt wereldwijd geteeld in tropische en gematigde gebieden voor de olie uit de oliehoudende zaden. De belangrijkste produktielanden voor ricinusolie zijn India, Brazilië, Rusland en Argentinië [7].

Alle delen van de ricinusplant maar speciaal de zaden zijn voor mens en dier zeer toxisch. In de giftige persresten van de zaden, waarvan de olie voor technische en medische doeleinden wordt toegepast, komen ten minste drie toxische stoffen voor, het eiwit ricine, een allergeen (vermoedelijk een proteose) en het alkaloïde ricinine [7]. Ricinuspersresten, ook in sporen, kunnen tot ziekte en zelfs de dood van de dieren leiden, waaraan ze gevoederd worden. Kenmerkend voor ricinusvergiftiging is de lange tijd tussen de opname en het optreden van de eerste vergiftigingsverschijnselen. Deze kan meer dan 10 tot 12 uur bedragen. [5]. In de Verordening Vvr. ongewenste stoffen en produkten is een maximum

toelaatbaar gehalte vastgesteld, uitgedrukt in ricinuszaaddoppen, van 10 mg per kg [2]. Deze bijzonder lage grenswaarde is alleen maar mogelijk omdat er voor het kwantitatieve ricinusonderzoek een methode is ontwikkeld waarbij de ricinuszaadschilletjes uit verdachte produkten worden geïsoleerd en gekwantificeerd [8].

2.4 *Crotalaria spp.*

Crotalaria (*Crotalaria spp.*, fam. *Leguminosae*) hoort thuis in de tropen en subtropen. In het zuiden van de Verenigde Staten wordt *crotalaria* toegepast als groenbemester. De zaden bevatten het alkaloïde monocrotaline en ze zijn zeer giftig voor vee en pluimvee. Niet alle species zouden echter toxisch zijn [9]. In de Verordening Vvr Ongewenste stoffen en produkten 1988 wordt niet aangegeven welke specifieke *Crotalaria*soorten ongewenst zijn in het diervoeder [2]. Daarom is een identificatie op het niveau van geslacht voldoende.

3 MONSTERMATERIAAL EN METHODEN

3.1 Monstermateriaal

Bij het ontwikkelen van microscopische methoden voor de identificatie van botanische onzuiverheden is gebruik gemaakt van de verzameling referentiemonsters van RIKILIT-DLO.

3.2 Methoden van onderzoek

3.2.1 Monstervoorbereiding

Het laboratoriummonster wordt na zorgvuldig mengen verkleind tot een deelmonster van ongeveer 50 g. Dit deelmonster wordt uitgespreid op een gladde droge ondergrond in een dunne laag en beoordeeld op geur, kleur, vorm van de pellets, e.d. Hiervan wordt een analysemonster van ongeveer 10 g genomen volgens de uitkruismethode [10]. Als het monster geheel of gedeeltelijk uit pellets bestaat moeten deze pellets eerst verkleind worden. Dit wordt uitgevoerd door in een mortier de pellets voorzichtig fijn te wrijven tot kleinere deeltjes. Deze methode van verkleinen van de pellets geeft minder fijne deeltjes of bloem dan het malen van de pellets met een molen. Zeer kleine deeltjes zijn namelijk moeilijker te identificeren met een stereomicroscop.

Het analysemonster wordt vervolgens gezeefd in drie fracties: een grove fractie ($> 355 \mu\text{m}$), een middelfijne fractie ($< 355 \mu\text{m}$, $> 250 \mu\text{m}$) en een fijne of bloemfractie ($< 250 \mu\text{m}$) [11].

De voorbereiding van een monster voor het onderzoek naar ricinuszaadschillen en de kwantitatieve bepaling hiervan wordt uitgevoerd volgens Ref. No. ISO 5061 [8].

3.2.2 Microscopisch onderzoek

A. Stereomicroscopisch onderzoek

De grove en middelfijne fractie van het monster worden onder de stereomicroscoop met geschikte vergrotingen (8* tot 50*) onderzocht. De deeltjes worden daarbij op hun uiterlijke fysische kenmerken (vorm, kleur, textuur, etc.) geïdentificeerd. Vastgesteld wordt of er deeltjes aanwezig zijn die behoren tot een van de genoemde ongewenste producten.

In het geval er bestanddelen van een van de ongewenste producten aanwezig zijn, wordt er een semikwantitatieve schatting gemaakt. Indien mogelijk dient het gehalte kwantitatief te worden vastgesteld door het ongewenste product uit te zoeken en te wegen.

B. Microscopisch onderzoek

Onderzoek met de microscoop voor de bevestiging van de stereomicroscopische identificatie is meestal noodzakelijk. Een zeer geringe hoeveelheid monstermateriaal van de fijne fractie die men nader wil onderzoeken, wordt op een aantal voorwerpglasjes gebracht. Vervolgens wordt hieraan een paar druppels van een beperkt aantal reagentia of inbedmiddelen toegevoegd, voorzichtig gemengd en na het aanbrengen van een dekglas onder de microscoop onderzocht met vergrotingen van 100*, 160* en 400*. Toegepast worden ondermeer de volgende reagentia of inbedmiddelen:

Joodkaliumjodide-oplossing (Lugoloplossing):

2 g kaliumjodide, 1 g jodium in 300 ml water. Dit reagens kleurt zetmeel donkerblauw of blauwviolet, eiwitten geel.

Kaliumhydroxide-oplossing:

25 g in 100 ml water. Hierin lost zetmeel grotendeels op (ophelderingsmiddel) zodat andere bestanddelen (celwanden, weefsels, gist) beter te herkennen zijn.

Oil Red O - oplossing:

0,5 g Oil Red O in 100 ml 2-propanol. Hiermee kunnen vet en olie gekleurd worden.

Chloralhydraat-oplossing:

80 g chloralhydraat in 50 ml water. Ook hierin lost zetmeel op zodat de cellulaire structuren duidelijker kunnen worden waargenomen. Een kleine hoeveelheid materiaal wordt hierbij gesuspenseerd in enkele druppels chloralhydraat en vervolgens wordt voorzichtig verhit tot kookpunt. Na afkoelen wordt een druppel chloralhydraat als inbedmiddel aan het preparaat toegevoegd.

Het microscopisch onderzoek van ongewenste producten begint met een onderzoek bij een vergroting van 100* naar diagnostisch bruikbare elementen. Bij de identificatie kan relevante literatuur geraadpleegd worden [3,4,7,8]. Verder kan bij de identificatie gebruik worden gemaakt van preparaten van producten waarvan de identiteit is vastgesteld (referentiemonsters).

3.2.3 Opnametechniek

Van microscopische preparaten worden micro-opnamen gemaakt met verschillende objectieven (100*, 160* en 400*) met of zonder gepolariseerd licht. Van hele zaden en vruchten of delen hiervan worden stereomicroscopische opnamen gemaakt (8* tot 50*) of macro-opnamen (TV zoomlens, $f = 20-80$ mm). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een CCD-camera en een databankprogramma ('Treasury Imaging Database'). De beelden worden vastgelegd in TIF-formaat (16 bit, 33768 kleuren). Opgeslagen beelden worden uitgeprint op een kleurenprinter (NEC Colormate PS/80 in 300 dpi).

4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 Moederkoren (*Claviceps purpurea*)

Moederkorensclerotiën zijn rechte of gekromde, 2-3 cm lange, zwarte korrels. De breukvlakken zijn glad en hoornachtig. Het inwendige van de korrel is witgrijs met een smalle donkere rand. De geur is schimmelig.

De sclerotiën bestaan uit een pseudoparenchym met cilindrische dicht opeen gepakte hyphen, waarvan de tamelijk dikke celwand uit chitine bestaat. De cellen bevatten proteïden en olie. De blauwviolette kleur van de randzone wordt veroorzaakt door het sklererythrine, een kleurstof, die in chloralhydraat helder rood oplost. Veel oliedruppels zijn in dit preparaat zichtbaar [3,4]. In zonnebloemzaden en ook in sojascreenings komen soms sclerotiën voor. Deze behoren niet tot *Claviceps purpurea* maar tot een sclerotinia-soort b.v. *Sclerotinia sclerotium*. Het is niet bekend of deze sclerotiën bij dieren vergiftigingen veroorzaken.

4.2 Giftige onkruidzaden

4.2.1 Dolik - *Lolium temulentum* L.

De graanvrucht van dolik (*Lolium temulentum* L., fam. Gramineae) is 6-7 mm lang, 2,5-3 mm breed en 2-2,2 mm dik. Het buitenste kroonkafje is geelgrijs, of bruin. Het bovenste deel is glanzend. De rugzijde is afgevlakt en heeft vijf niet zo duidelijke ribben. De punt is afgestompt. De rand van het buitenste kroonkafje grijpt slechts weinig over het binnenste kafje heen. De kafnaald is tot 12 mm lang maar meestal afgebroken. Het steeltje is tot 3 mm lang, ligt dicht tegen de korrel aan, is afgevlakt en ovaal. De vrucht is met de kafjes vergroeid. Deze is eveneens ovaal, heeft een diepe groef en is bruinzwart van kleur [12]. De graanvrucht is meestal besmet met de endofytische schimmel *Endoconium temulentum*. Dit is aan de buitenzijde niet te zien. Microscopisch is tussen het perisperm (nucellus) en het endosperm (aleuroniaag) deze schimmel wel vast te stellen als een 20 μ m dikke laag hyphen zonder dwarswanden. Verder zijn de dwarscellen van de vruchtwand karakteristiek. Deze bevatten een bruin pigment dat in chloralhydraat rood kleurt [3].

4.2.2 Vlasdolik - *Lolium remotum* Schrank

De graanvrucht van vlasdolik (*Lolium remotum* Schrank, fam. Gramineae) is 4-6 mm lang, 1,6-2 mm breed en 0,8-1,2 mm dik met een tot 8 mm lange kafnaald, die vaak is afgebroken. De korrel is ovaal, aan de top puntig en de basis rond. Het oppervlak is vuilgrijs tot grijsbruin. Het kroonkafje aan de rugzijde is vlak, de zijden zijn afgerond. De middennerf, die in de kafnaald overgaat, is duidelijk te zien. Het kafje aan de buikzijde is breed, vlak met inzinkingen. Beide kafjes zijn met de korrel vergroeid. Het steeltje ligt dicht tegen de korrel aan en is afgevlakt ovaal. Het eindvlak is iets schijfvormig verbreed [12]. Ook bij deze soort bevindt zich een schimmellaag tussen het perisperm (nucellusrest) en endosperm (aleuronaalag) [5]. Het aantonen hiervan kan op dezelfde wijze als bij dolik worden uitgevoerd.

4.2.3 Doornappelzaad - *Datura stramonium* L.

De zaden van de doornappel (*Datura stramonium* L., fam. Solanaceae) zijn 3,3-3,8 mm lang, 2,8-3 mm breed en 1,2-1,5 mm dik. Het oppervlak is donkergrijs, bruinzwart tot zwart en mat. Het is bezet met kleine wratjes, ruw en rimpelig. De zaden zijn afgeplat, niervormig tot bijna halfcirkelvormig. De navel is spits driehoekig, geelachtig wit en bij oude zaden bruin. Het endosperm is wit [14]. Kenmerkend voor doornappelzaad zijn de fragmenten van de zaadhuid. De epidermiscellen hiervan bevatten een zwart pigment. De cellen hebben dikke en diep gegolfde wanden. Van boven af gezien zijn de cellen stervormig. In UV-licht met chloralhydraat fluoresceren de deeltjes van de zaadhuid groenblauw. Deze fluorescentie wordt goudgeel door toevoeging van loog [3,9].

4.3 Ricinuszaden - *Ricinus communis* L.

Ricinuszaden of -bonen (*Ricinus communis* L.) zijn 6 tot 18 mm lang, 5 tot 18 mm breed en 3 tot 8 mm dik. De zaadkleur varieert buitengewoon. Meestal zijn de zaden gevamd. De epidermiscellen zonder pigment zijn door lucht in de cellen witgrijs. De cellen kunnen ook een geel, geelbruin, bruinrood, rood of zwart pigment bevatten. Het oppervlak is meestal glad en glanzend. De caruncula is indien aanwezig meestal wit. De zaadhuid is uitzonderlijk bros en hard. Bij versplintering zijn de fragmenten gaafkantig. De zaadhuid bestaat uit vijf lagen. De drie buitenste lagen worden "weggekookt" bij behandeling met zuur en loog. Men houdt dan de meest kenmerkende laag de palissadesklereïden over. De epidermis bestaat uit vijf- tot zevenhoekige cellen. De kleinste epidermiscellen zijn ongeveer 19 μm lang en 12 μm breed, de grotere cellen zijn tot 76 μm lang en 46 μm breed. De cellen zijn meestal kubusvormig tot enigszins in de breedte gestrekt, de hoogte varieert van 7 tot 23 μm . Onder de epidermis ligt een parenchymlaag bestaande uit vier tot zes lagen sterk samengedrukte grote cellen. Naast pigment komen ook verspreid calciumoxalaatkristallen voor. Hierop volgt een carbonaatcellen- of prismacellenlaag. Deze laag kan echter ook ontbreken. Daarop volgt de meest kenmerkende laag de sklereïdenlaag. Deze bestaat uit dikwandige bruine cellen, vijf- tot zevenhoekig, het lumen is zeer smal. De doorsnede van de cellen bedraagt 10 tot 15 μm , de lengte 140 tot 250 μm (gemiddeld 200 μm). Ze zijn knievormig gebogen. Het endospermweefsel bevat talrijke calciumoxalaatkristallen en aleuronkorrels [7,9].

Ricinuschroot is zwartgrijs van kleur. Opvallend zijn de relatief dikke scherpkantige zwarte zaadhuiddeeltjes, die door het lichtere endosperm omgeven worden. Aan de hand van de schildeeltjes, waarvan de glanzende vaak gemarmerde epidermis is afgewreven, kunnen - na een specifieke voorbehandeling - ook zeer geringe hoeveelheden ricinusafvallen in andere oliezaadprodukten met behulp van een stereomicroscop aangetoond worden [8].

4.4 Crotalariazaden - *Crotalaria* spp.

De zaden van crotalaria i.c. zonnehennep (*Crotalaria retusa* L., fam. Leguminosae) zijn 5-6 mm lang, 3,5-4,5 mm breed en 2-2,5 mm dik. Het oppervlak is geelbruin, glad en glanzend. Het zaad is breed-niervormig, afgevlakt met een sterk gebogen wortelpunt. Daardoor verloopt de insnijding scheef en gekromd. Het worteltje is ongeveer 2/3 van de lengte van de zaadlobben [12]. De kleur en de grootte kan variëren per soort. *Crotalaria spectabilis* is 4-5 lang en 3-4 mm breed, glad, glanzend, grijsbruin of zwart met een uitstekende navel. *Crotalaria juncea* is 7-8 mm lang en 4-5 mm breed, glad, glanzend, met een diepe uitsparing aan het voorste uiteinde dat zich over de navel uitstrekt. *Crotalaria striata* is 3-4 mm lang en 2-3 mm breed, glad, strogeel met een uitstekende navel.

Microscopische identificatie vindt meestal plaats aan de hand van de zaadhuid. Zetmeelkorrels zijn in crotalariazaad niet aanwezig. De epidermis van de zaadhuid van *Crotalaria striata* bestaat uit palissadecellen of macrosklereïden die ca. 60 μm hoog zijn. De epidermis is bedekt met een duidelijke cuticula van ca. 25 μm dik. De hypodermis bestaat uit dragercellen van het zandloperstype. Deze zijn ca. 25 μm lang en aan de top en de basis ca. 20 μm breed. In tegenstelling tot de beschrijving van Vaughan komen in de zaadhuid van *Crotalaria* spp. geen flesvormige dragercellen (lagenosklereïden) voor [9]. *Crotalaria* spp. verschilt van de meeste andere leguminosenzaden doordat het endospermweefsel met water verslijmd.

5 CONCLUSIES

Met behulp van microscopisch onderzoek i.c. morfologisch, anatomisch en histologisch onderzoek is het mogelijk om de botanische onzuiverheden - zoals die in Bijlage 1 bij Verordening Vvr. Ongewenste stoffen en produkten genoemd worden - te identificeren. Gebaseerd op de belangrijkste hoofdelementen is het volgende onderscheid te maken:

- Moederkoren is zowel stereomicroscopisch als microscopisch te identificeren. Het mag maximaal tot 0,1% in alle diervoeders voorkomen, die geen gemalen graan bevatten. Doordat gemalen granen worden uitgezonderd en moederkoren daar mogelijk juist in voor kan komen, is het onwaarschijnlijk dat een diervoeder op grond van de aanwezigheid van moederkoren niet aan de gestelde eis voldoet.

- Dolikzaden en vladolikzaden zijn stereomicroscopisch te identificeren. De toxiciteit van dolikzaad en vladolikzaad berust op de aanwezigheid van de mycotoxinevormende endofytische schimmel *Endoconidium temulentum*. De aanwezigheid van schimmelhyphen in dolikzaad is microscopisch vast te stellen.
- De aanwezigheid van doornappelzaden (*Datura spp.*) in diervoeders is microscopisch vast te stellen. In de Bijlage bij de Verordening Vvr Ongewenste stoffen en producten 1988 wordt een maximumgehalte aan doornappelzaad en wel *D. stramonium* toegestaan van maximaal 0,1%. Andere soorten doornappelzaad worden niet vermeld. Deze kunnen worden gerangschikt onder onkruidzaden die alkaloiden bevatten waarvoor een maximumgehalte van 0,3% is toegestaan. Sinds een aantal jaren worden hoge gehalten aan *D. ferox* vastgesteld in het bijzonder in Argentijnse en Braziliaanse sojaschroot. *D. ferox* is een wijdverbreid onkruid in Zuid Amerika. Het alkaloidgehalte van beide doornappelzaadsoorten is van gelijke orde. Op grond hiervan zou in de Verordening geen onderscheid tussen *D. stramonium* en *D. ferox* gemaakt moeten worden.
- Ricinuszaadschillen of -doppen zijn microscopisch te identificeren. In de Verordening Vvr. ongewenste stoffen en producten is een maximum toelaatbaar gehalte vastgesteld, uitgedrukt in ricinuszaaddoppen, van 10 mg per kg. Deze bijzonder lage grenswaarde is alleen maar mogelijk omdat er voor het kwantitatieve ricinusonderzoek een methode is ontwikkeld waarbij het mogelijk is om de zaadschilletjes uit verdachte producten te isoleren en te kwantificeren.
- In diervoeders zijn crotalariazaden te identificeren. In de Verordening Vvr Ongewenste stoffen en producten 1988 wordt niet aangegeven welke specifieke Crotalaria-soorten ongewenst zijn in het diervoeder. Daarom is een identificatie op het niveau van geslacht voldoende.

LITERATUUR

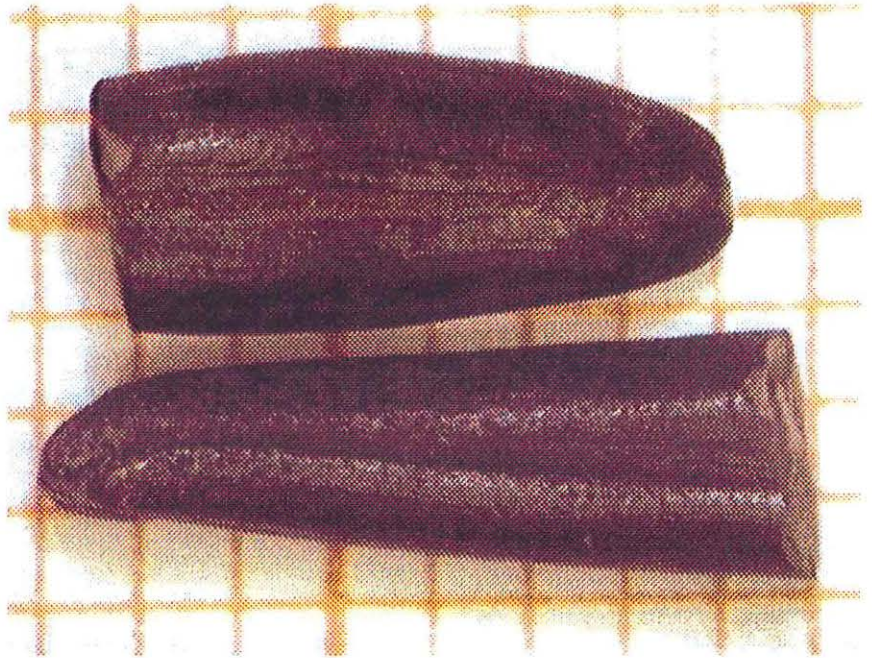
1. Richtlijn van de Raad van 17 dec. 1973 inzake ongewenste stoffen en producten in de diervoeding.
PB E.G. Nr. L 38/31 (1974) zoals gewijzigd april 1994.
2. Verordening Vvr. Ongewenste stoffen en producten 1988.
Bundel Diervoederwetgeving in Nederland: Deel I. Bijlage I: Maximum gehalten aan ongewenste stoffen en producten in diervoeders, sub 3. Botanische onzuiverheden.
Uitgave Produktschap voor Veevoeder, Den Haag (1995).
3. Gassner, G., B. Hohmann und F. Deutschmann
Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel. 5. Auflage.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1989) 414 blz.

4. Fischer, R. und Th. Kartnig
Drogenanalyse. 5. Auflage
Springer Verlag, Wien New York (1978) p. 32.
5. Stählin, A.
Die Beurteilung der Futtermittel, Teil 2. Spezielle Beurteilung.
Methodenbuch, Band XII. Herrmann, R. (ed.).
Neumann Verlag, Radebeul, etc. (1957) 807 blz.
6. Anon.
Protokoll der Arbeitstagung der Sektion Futtermittelmikroskopie
Speyer (1987) 99-101.
7. Vaughan, J.G.
The structure and utilization of oil seeds.
Chapman and Hall Ltd., London (1970) 279 blz.
8. Animal Feeding stuffs - Determination of castor oil seed husks - Microscopical method
Ref. No ISO 5061 (1983) 6 blz.
9. Vaughan, J.G. and J.A. Stubbs
Animal feeds - plant constituents.
In: J.G. Vaughan (ed.).
Food Microscopy.
Academic Press, London, etc. (1979) 393-424.
10. RSV A0678: Diervoeders - Reductie van het laboratoriummonster tot analysmonster ten behoeve
van het microscopisch onderzoek. 2^e editie.
RIKILT-DLO, Wageningen (1994).
11. RSV A0679: Diervoeders - Monstervoorbereiding voor het microscopisch onderzoek. 2^e editie.
RIKILT-DLO, Wageningen (1994).
12. Brouwer, W. und A. Stählin
Handbuch der Samenkunde, 2. Auflage
DLG-Verlag, Frankfurt (Main) (1975) 655 blz.

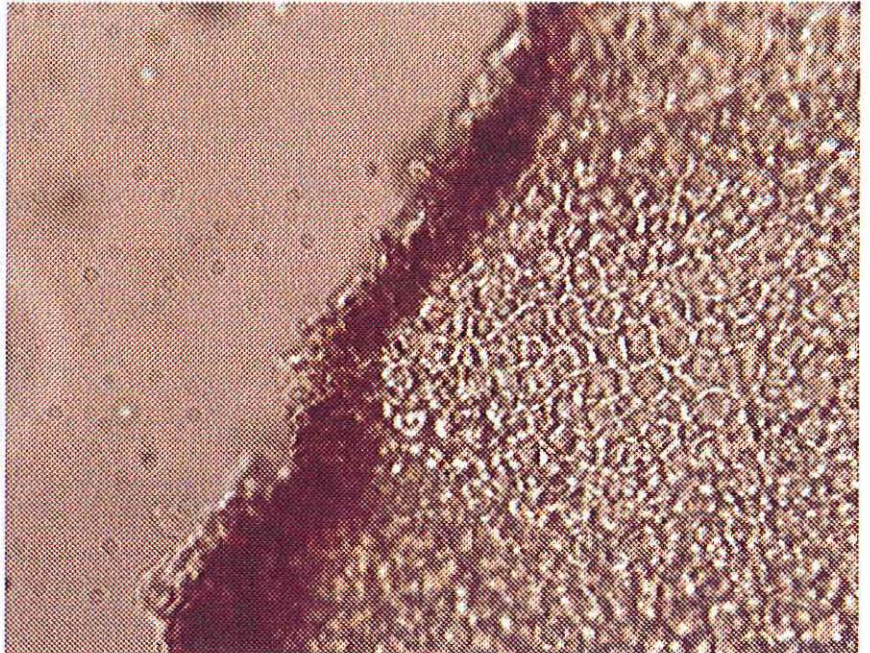
BIJLAGE Afbeeldingen van de belangrijkste kenmerken op grond waarvan ongewenste producten kunnen worden geïdentificeerd.

Beschrijving:

Stereomicroscopische identificatie (8*)
Moederkorensclerotien zijn rechte of gekromde, 2-3 cm lange, zwarte korrels. De breukvlakken zijn glad en hoornachtig. Het inwendige van de korrel is witgrijs met een smalle donkere rand. De geur is schimmelig.

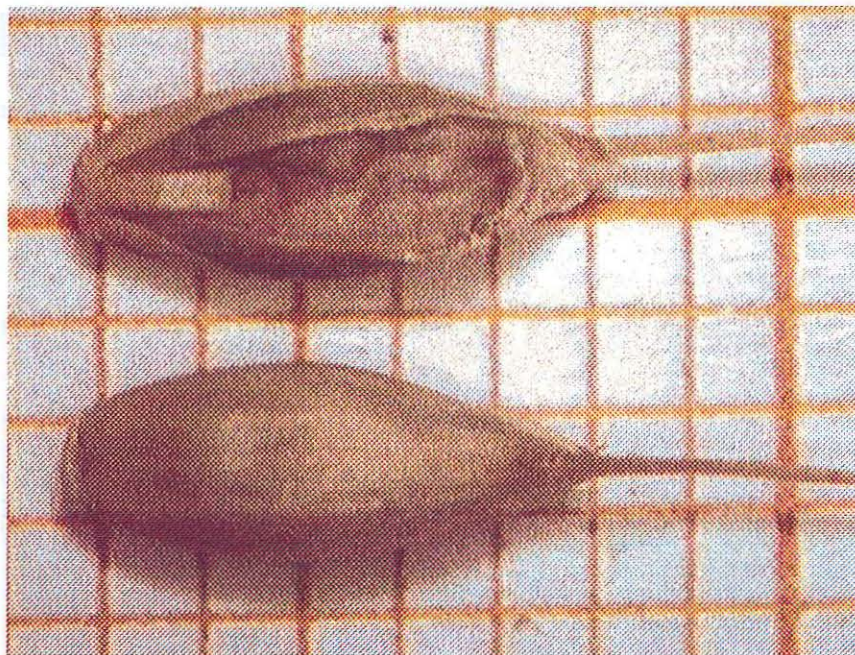
Produktnaam: Moederkoren**Verzamelnr.:** NV H-3**Image file:** j:\moederk1.tif**Beschrijving:**

Microscopische identificatie (400*).
Chloralhydraatpreparaat. Sclerotium, dwars.
Sclerotien bestaan uit een pseudoparenchym van cilindrische dicht opeengepakte hyfen, waarvan de tamelijk dikke celwand uit chitine bestaat. De cellen bevatten proteïden en olie. De blauwvioletten kleur van de randzone wordt veroorzaakt door het sklererythrine, een kleurstof, die in chloralhydraat helder rood oplost. Veel oliedruppels zijn in dit preparaat zichtbaar.

Produktnaam: Moederkoren**Verzamelnr.:** NV H-3**Image file:** j:\moederk2.tif

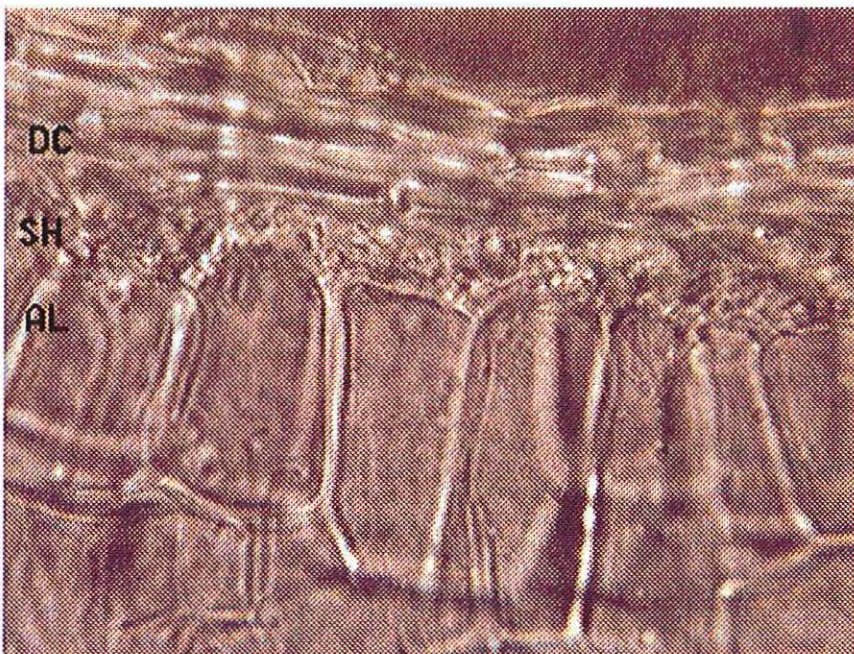
Beschrijving:

Stereomicroscopische identificatie (8*). De graanvrucht van dolik (*Lolium temulentum* L.) is 6-7 mm lang, 2,5-3 mm breed en 2-2,2 mm dik. Het buitenste kroonkafje is geelgrijs, of bruin.. Het bovenste deel is glanzend. De rugzijde is afgevlakt en heeft vijf niet zo duidelijke ribben. De punt is afgestompt. De rand van het buitenste kroonkafje grijpt slechts weinig over het binnenste kafje heen. De kafnaald is tot 12 mm lang maar meestal afgebroken. Het steeltje is tot 3 mm lang, ligt dicht tegen de korrel aan. Deze is eveneens ovaal, heeft een diepe groef en is bruinzwart van kleur.

Produktnaam: Dolik**Verzamelnr.:** OZ L-39**Image file:** j:\loliumt1.tif**Beschrijving:**

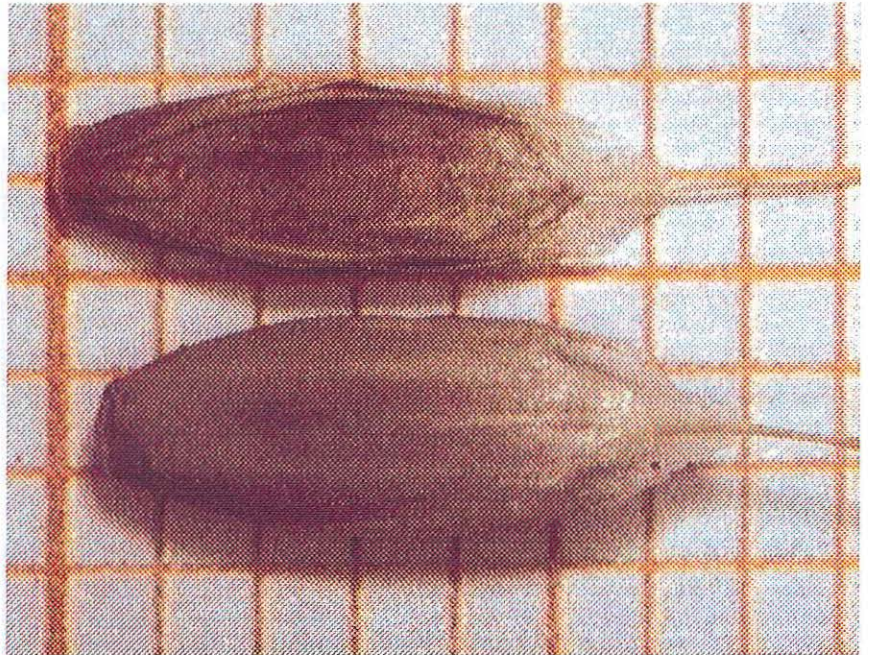
Microscopische identificatie (400*). Chloralhydraatpreparaat. Zaadhuid, dwars. De graanvrucht is meestal besmet met de endofytische schimmel *Endoconium temulentum*. Tussen het perisperm (nucellus) en het endosperm (aleuronlaag) bevindt zich een tot 20 micrometer dikke laag hyphen zonder dwarswanden. Verder zijn de dwarscellen van de vruchtwand karakteristiek. Deze bevatten een bruin pigment dat in chloralhydraat rood kleurt.

DC = dwarscellenlaag
SH = schimmelhyphen
AL = aleuronlaag

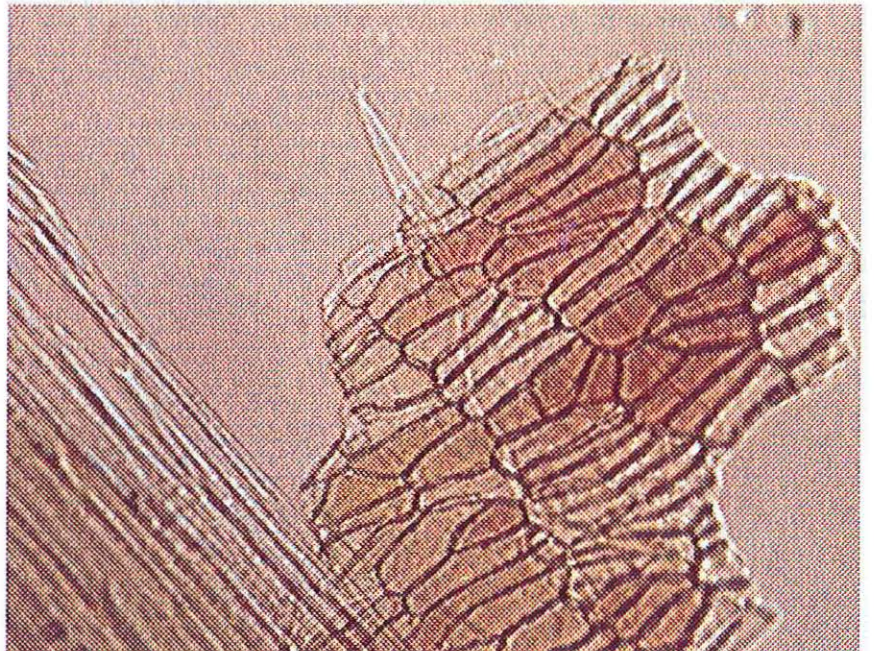
Produktnaam: Dolik**Verzamelnr.:** OZ L-39**Image file:** j:\loliumt2.tif

Beschrijving:

Stereomicroscopische identificatie (8*). De graanvrucht van vlasdolik (*Lolium remotum* Schrank) is 4-6 mm lang, 1,6-2 mm breed en 0,8-1,2 mm diik met een tot 8 mm lange kafnaald, die vaak is afgebroken. De korrel is ovaal, aan de top puntig en aan de basis rond. Het oppervlak is vuilgrijs tot grijsbruin. Het kroonkafje aan de rugzijde is vlak, de zijden zijn afgerond. De middennerf, die in de kafnaald overgaat, is duidelijk te zien. Het kafje is aan de buikzijde breed, vlak met inzinkingen. Beide kafjes zijn met de korrel vergroeid. Het steeltje ligt dicht tegen de korrel aan en is afgevlakt ovaal. Het eindvlak is iets schijfvormig verbreed.

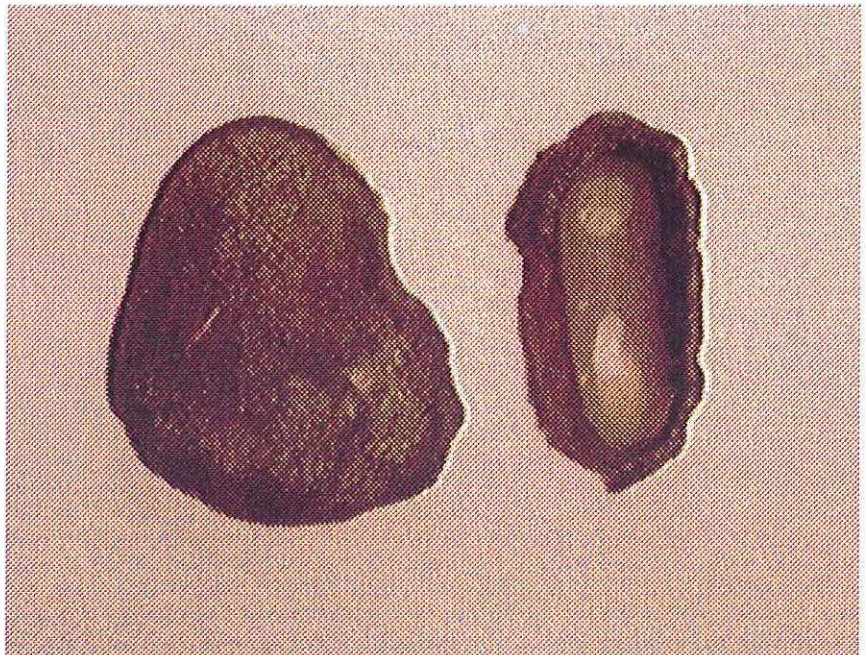
Produktnaam: Vlasdolik**Verzamelnr.:** OZ L-36**Image file:** j:\loliumr1.tif**Beschrijving:**

Microscopische identificatie (160*). Chloralhydraatpreparaat, vruchtwand. De dwarscellen van de vruchtwand bevatten een bruinpigment dat in chloralhydraat rood kleurt.

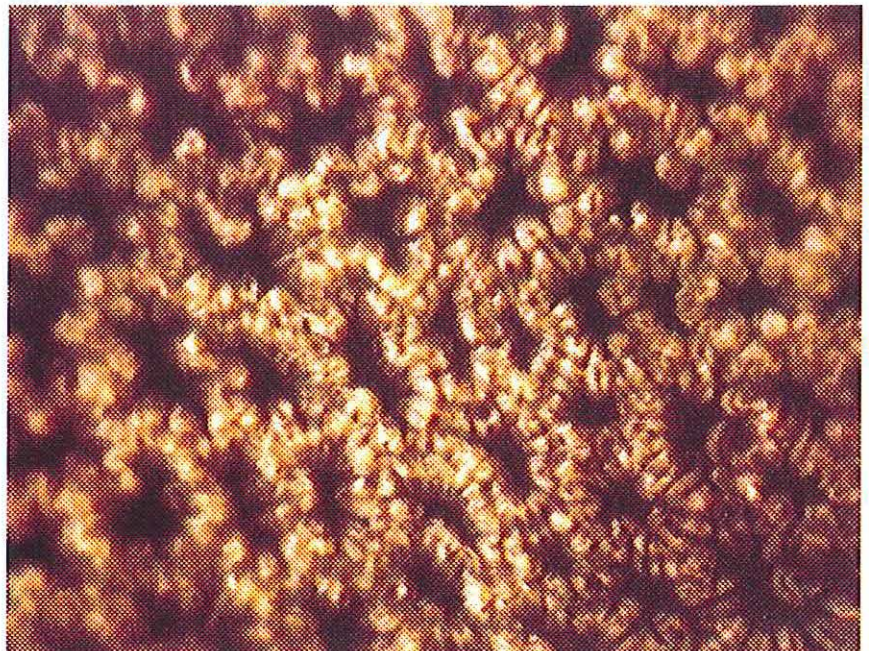
Produktnaam: Vlasdolik**Verzamelnr.:** ZC G-38**Image file:** j:\loliumr2.tif

Beschrijving:**Produktnaam:** Datura stramonium

Stereomicroscopische identificatie (8*). De zaden van de doornappel (*Datura stramonium* L.) zijn 3,3-3,8 mm lang, 2,8-3mm breed en 1,2-1,5 mm dik. Het oppervlak is donkergrijs, bruinzwart tot zwart en mat. Het is bezet met kleine wratjes, ruw en rimpelig. De zaden zijn afgeplat, niervormig tot bijna halfcirkelvormig. De navel is spits driehoekig, geelachtig wit en bij oude zaden bruin. Het endosperm is wit.

**Verzamelnr.:** NV D-16**Image file:** j:\datura1.tif**Beschrijving:****Produktnaam:** Datura stramonium

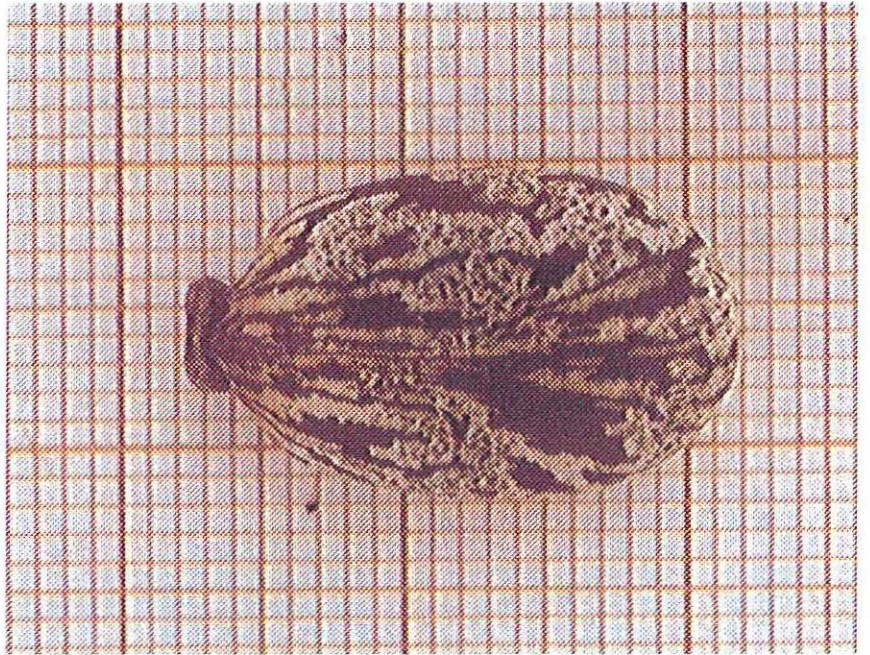
Microscopische identificatie (160*). Chloralhydraatpreparaat, zaadhuid. Kenmerkend voor doornappelzaad zijn de fragmenten van de zaadhuid. De epidermiscellen hiervan bevatten een zwart pigment. De cellen hebben dikke en diep gegolfde wanden. Van bovenaf gezien zijn de cellen stervormig. In UV-licht met chloralhydraat fluoresceren de deeltjes van de zaadhuid groenblauw. Deze fluorescentie wordt goudgeel door toevoeging van loog.

**Verzamelnr.:** NV D-16**Image file:** j:\datura2.tif

Beschrijving:

Macro-opname ricinusboon (*Ricinus communis* L.).

Ricinuszaden of -bonen zijn 6 mm tot 18 mm lang, 5 tot 18 mm breed en 3 tot 8 mm dik. De zaadkleur varieert buitengewoon. Meestal zijn de zaden gevland. De epidermiscellen zonder pigment zijn door de lucht in de cellen witgrijs. De cellen kunnen ook een geel, geelbruin, bruinrood, rood of zwart pigment bevatten. De witte caruncula is meestal verdwenen.

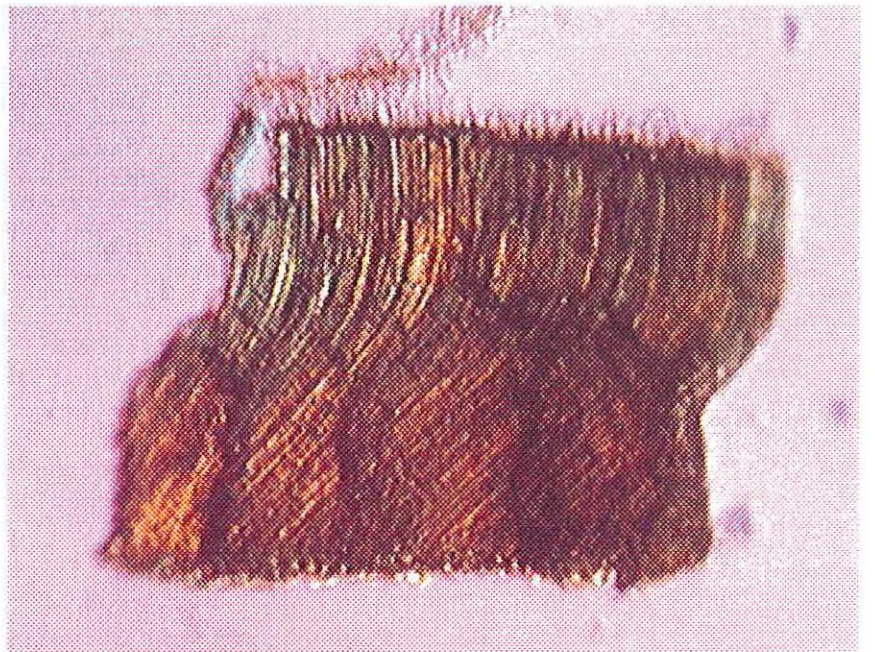
Produktnaam: Ricinusboon**Verzamelnr.:** ZC E-12**Image file:** j:\ricinus1.tif**Beschrijving:**

Microscopische identificatie (100*).

Chloralhydraatpreparaat,
gepolariseerd licht + Rood I.

Palissadelaag, dwars.

De palissadelaag of sklereidenlaag bestaat uit dikwandige bruine cellen, vijf- tot zevenhoekig, het lumen is zeer smal. De doorsnede van de cellen bedraagt 10 tot 15 micrometer, de lengte 140 tot 250 micrometer (gemiddeld 200 micrometer). Ze zijn knievormig gebogen.

Produktnaam: Ricinusboon**Verzamelnr.:** ZC E-12**Image file:** j:\ricinus2.tif

Beschrijving:

Stereomicroscopische identificatie (12*).

Crotalaria striata-zaden is 3-4 mm lang en 2-3 mm breed, glad, strogeel, oudere zaden licht bruin, glanzend met een uitstekende navel. Het zaad is breed niervormig, afgevlakt met een sterk gebogen wortelpunt. Daardoor verloop de insnijding scheef en gekromd.

Produktnaam: Crotalaria striata L.**Verzamelnr.:** ZC L-20**Image file:** j:\crotala1.tif**Beschrijving:**

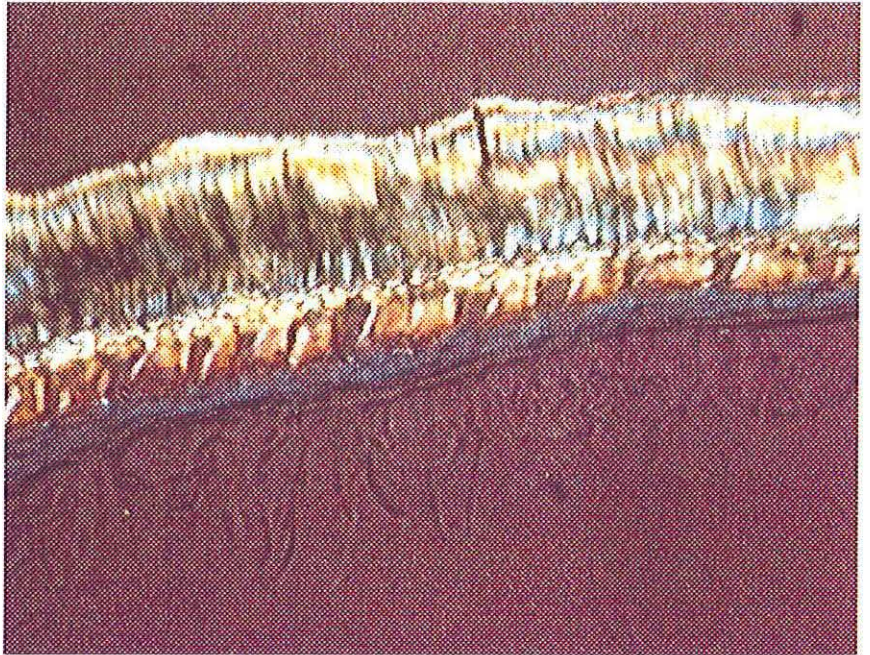
Stereomicroscopische identificatie (8*). De zaden van crotalaria i.c. zonnehennep (Crotalaria retusa L.) zijn 5-6 mm lang, 3,5-4,5 mm breed en 2-2,5 mm dik. Het oppervlak is geelbruin, glad en glanzend. Het zaad is breed-niervormig, afgevlakt met een sterk gebogen wortelpunt. Daardoor verloopt de insnijding scheef en gekromd. Het worteltje is ongeveer 2/3 van de lengte van de zaadlobben.

Produktnaam: Crotalaria retusa L.**Verzamelnr.:** ZC L-19**Image file:** j:\crotala2.tif

Beschrijving:

Microscopische identificatie (160*).
Chloralhydraatpreparaat,
gepolariseerd licht + Rood I. Zaadhuid,
dwars.

De epidermis van de zaadhuid van
Crotalaria striata bestaat uit
palissadecellen of macrosklereiden, die
ca. 60 micrometer hoog zijn. De
epidermis is bedekt door een duidelijke
cuticula van ca. 25 micrometer dik.
Deze is in gepolariseerd licht echter
minder duidelijk waar te nemen. De
hypodermis bestaat uit dragercellen
van het zandloperstype. Deze zijn ca. 25
micrometer lang en aan top en basis
ca. 20 micrometer breed.

Produktnaam: *Crotalaria striata***Verzamelnr.:** ZC L-20**Image file:** j:\crotala3.tif